

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

27.10.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 4 年   2 月 1 3 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 4 - 0 3 6 6 1 3  
Application Number:  
[ST. 10/C]:      [ J P 2 0 0 4 - 0 3 6 6 1 3 ]



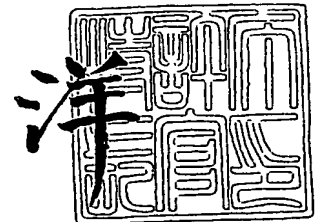
出 願 人      学校法人慶應義塾  
Applicant(s):      中外製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 2 月   3 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 040135  
【提出日】 平成16年 2月13日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A61K  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都港区三田二丁目 1 5 番 4 5 号 学校法人慶應義塾内  
    【氏名】 福田 恵一  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都港区三田二丁目 1 5 番 4 5 号 学校法人慶應義塾内  
    【氏名】 藤田 淳  
【特許出願人】  
    【識別番号】 598121341  
    【氏名又は名称】 学校法人慶應義塾  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000003311  
    【氏名又は名称】 中外製薬株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100089705  
    【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 2 0 6 区  
    ユアサハラ法律特許事務所  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 社本 一夫  
    【電話番号】 03-3270-6641  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100076691  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 増井 忠式  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100075270  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 小林 泰  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100080137  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 千葉 昭男  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100096013  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 富田 博行  
【先の出願に基づく優先権主張】  
    【出願番号】 特願2003-366480  
    【出願日】 平成15年10月27日  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 051806  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0107764

**【害類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）を有効成分として含む線維芽細胞動員剤。

**【請求項 2】**

創傷した組織に線維芽細胞を動員することを特徴とする請求項 1 記載の動員剤。

**【請求項 3】**

心臓へ線維芽細胞を動員することを特徴とする請求項 1 記載の動員剤。

**【請求項 4】**

心臓が心疾患発症後の心臓であることを特徴とする請求項 3 記載の動員剤。

**【請求項 5】**

心疾患が心筋梗塞である請求項 4 記載の動員剤。

**【請求項 6】**

G-CSF を有効成分として含む、心疾患発症後の心臓における線維芽細胞の生着剤。

**【請求項 7】**

心疾患が心筋梗塞である請求項 6 記載の生着剤。

**【請求項 8】**

心疾患発症後の心臓が、心筋梗塞後の心筋梗塞巣である請求項 6 記載の生着剤。

**【請求項 9】**

G-CSF を有効成分として含む創傷治療剤。

**【請求項 10】**

有効量の G-CSF を投与することを含む、線維芽細胞動員方法。

**【請求項 11】**

有効量の G-CSF を投与することを含む、線維芽細胞を心疾患発症後の心臓に生着させるための方法。

**【請求項 12】**

有効量の G-CSF を投与することを含む、創傷治療方法。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】G-CSFを含む線維芽細胞動員剤及び創傷治療剤

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）を有効成分として含む線維芽細胞動員剤に関する。また、本発明は、G-CSFを有効成分として含む線維芽細胞の生着剤に関する。さらに、本発明は、G-CSFを有効成分として含む創傷治療剤に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

ヒトG-CSFは顆粒球系造血幹細胞の分化誘導因子として発見された造血因子であり、生体内では好中球造血を促進することから、骨髄移植や癌化学療法後の好中球減少症治療剤として臨床応用されている。また、上記作用のほかにも、ヒトG-CSFには、幹細胞に作用してその分化増殖を刺激する作用や骨髄中の幹細胞を末梢血中に動員する作用がある。実際に後者の作用に基づいて、臨床の現場では強力な化学療法を施行した後の癌患者の造血回復促進を目的として、ヒトG-CSFにより動員された末梢血造血幹細胞を移植する末梢血幹細胞移植術が行われている。

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0003】

本発明は、線維芽細胞を移植することなく、簡便に線維芽細胞を創傷組織に動員し、線維芽細胞を創傷組織に生着させ、そして創傷を治療することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0004】

本発明者は、心筋梗塞後の創傷組織の再生について検討を行った。その結果、G-CSFを投与することにより、心筋梗塞巣に線維芽細胞が移動し、心機能の低下が防止され、心臓のリモデリングを改善することを見出した。本発明はこの知見に基づき完成したものである。

## 【0005】

すなわち、本発明は、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）を有効成分として含む線維芽細胞動員剤を提供するものである。

また、本発明は、G-CSFを有効成分として含む、心疾患発症後の心臓における線維芽細胞の生着剤を提供するものである。

## 【0006】

また、本発明は、G-CSFを有効成分として含む創傷治療剤を提供するものである。

さらに、本発明は、有効量のG-CSFを投与することを含む、線維芽細胞動員方法を提供する。

## 【0007】

また、本発明は、有効量のG-CSFを投与することを含む、線維芽細胞を心疾患発症後の心臓に生着させるための方法を提供するものである。

また、本発明は、有効量のG-CSFを投与することを含む、創傷治療方法を提供するものである。

## 【発明の効果】

## 【0008】

心筋梗塞後にG-CSFを投与することにより、梗塞巣に骨髄細胞由来の心筋細胞が多数観察された。一方、その10倍近い数の線維芽細胞も観察された。すなわち、G-CSF投与により骨髄から種々の幹細胞由来の細胞が梗塞巣に遊走し、梗塞巣が再生され、心筋梗塞後のリモデリングを防止したことが明らかとなった。G-CSF投与により、急性期に白血球が多数浸潤するだけでなく、慢性期（梗塞後60日）に線維芽細胞が梗塞巣に移動することが創傷治癒を促進し、リモデリングを改善したと考えられる。心筋梗塞後の梗塞巣に線維芽細胞を移植することで梗塞巣のリモデリングが防止できたことが報告され

ている (Hutcheson KA, Atkins BZ, Hueman MT, Hopkins MB, Glower DD, Taylor DA, Transplant. 9, 2000, 359-368)。本発明においては、心筋梗塞後に G-CSF を投与することにより、骨髄から線維芽細胞を遊走させることができる。したがって、線維芽細胞を移植することなく梗塞巣のリモデリングを防止することが可能であり、臨床応用上極めて有利である。

#### 【0009】

また、この事実は心筋梗塞以外でも、外傷等の種々の創傷治癒過程において G-CSF を臨床応用することが出来ることを意味する。すなわち、創傷治癒過程において G-CSF を投与することにより、早期の顆粒球浸潤だけでなく線維芽細胞も供給され、創傷治癒を加速し、さらにより強固な治癒組織を作ることが可能である。これまで、創傷治癒時に G-CSF を投与すると、顆粒球を大量に浸潤させることとなり、組織破壊に繋がると考えられていたが (Romson, JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR, Circulation 67(5), 1983, 1016-1023)、本発明においては、G-CSF を投与することでより強固な創傷部位の治癒が可能である。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0010】

本発明は、G-CSF を有効成分として含む線維芽細胞動員剤に関するものである。線維芽細胞が動員される場所は特に制限されない。例えば、創傷を負った組織が存在する場合、G-CSF を投与することにより、創傷を負った組織に線維芽細胞を動員することが可能である。

#### 【0011】

本発明において創傷とは、体組織の障害・損傷のことをいい、例えば、心臓、肺、腎臓、腸、肝臓、腱などの内部組織や臓器への障害・損傷や、皮膚などへの外傷を含む。創傷を負った組織の具体的な例としては、心筋梗塞後の心臓を好適に挙げることができる。

#### 【0012】

線維芽細胞は、通常、結合組織の固有細胞であり、粗面小胞体とゴルジ装置の良好な発育を特徴とする楕円形の核と紡錘状の原形質を持つ細胞である。又、多くの臓器に存在する間葉系細胞で実質細胞を埋める役をする細胞も含まれる。線維芽細胞は通常、体内の間質物質（コラーゲン、フィブロネクチン、ムコ多糖など）を多量産生する能力を有する。創傷を負った組織に線維芽細胞を動員することにより、創傷の治癒を促進することが可能である。

#### 【0013】

又、本発明は G-CSF を有効成分として含む、心疾患発症後の心臓における線維芽細胞生着剤に関する。

心疾患の具体的な例としては、例えば、虚血性心疾患（心筋梗塞など）や心筋疾患（心筋症など）などを挙げることができる。例えば、心筋梗塞後に G-CSF を投与することにより、心筋梗塞巣へ線維芽細胞を生着させることが可能である。

#### 【0014】

さらに、本発明は G-CSF を有効成分として含む創傷治療剤に関するものである。

本発明に用いる G-CSF は、どのような G-CSF でも用いることができるが、好ましくは高度に精製された G-CSF であり、より具体的には、哺乳動物 G-CSF、特にヒト G-CSF と実質的に同じ生物学的活性を有するものである。G-CSF の由来は特に限定されず、天然由来の G-CSF、遺伝子組換え法により得られた G-CSF などをを用いることができるが、好ましくは遺伝子組換え法により得られた G-CSF である。遺伝子組換え法により得られる G-CSF には、天然由来の G-CSF とアミノ酸配列が同じであるもの、あるいは該アミノ酸配列中の 1 または複数のアミノ酸を欠失、置換、付加等したもので、天然由来の G-CSF と同様の生物学的活性を有するもの等であってもよい。アミノ酸の欠失、置換、付加などは当業者に公知の方法により行うことが可能である。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法 (Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275; Zoller, M.J. and Smith, M. (1983) Methods Enzymol. 100, 468-500; Kram

er, W. et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456; Kramer, W. and Fritz, H.J. (1987) Methods Enzymol. 154, 350-367; Kunkel, T.A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 488-492; Kunkel (1988) Methods Enzymol. 85, 2763-2766) などを用いて、G-C S Fのアミノ酸に適宜変異を導入することにより、G-C S Fと機能的に同等なポリペプチドを調製することができる。また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。一般的に、置換されるアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に置換されることが好ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸 (A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸 (R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸 (G、A、V、L、I、P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (S、T、Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸 (C、M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸 (D、N、E、Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸 (R、K、H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸 (H、F、Y、W) を挙げることができる (括弧内はいずれもアミノ酸の一文字表記を表す)。あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び/又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666; Zoller, M.J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500; Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433; Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

#### 【0015】

又、G-C S Fと他のタンパク質との融合タンパク質を用いることも可能である。融合ポリペプチドを作製するには、例えば、G-C S FをコードするDNAと他のタンパク質をコードするDNAをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよい。本発明のG-C S Fとの融合に付される他のタンパク質としては、特に限定されない。

#### 【0016】

又、化学修飾したG-C S Fを用いることも可能である。化学修飾したG-C S Fの例としては、例えば、糖鎖の構造変換・付加・欠失操作を行ったG-C S Fや、ポリエチレングリコール・ビタミンB12等、無機あるいは有機化合物等の化合物を結合させたG-C S Fなどを挙げることができる。

#### 【0017】

本発明で用いるG-C S Fは、いかなる方法で製造されたものでもよく、例えば、ヒト腫瘍細胞やヒトG-C S F産生ハイブリドーマの細胞株を培養し、これから種々の方法で抽出し分離精製したG-C S F、あるいは遺伝子工学的的手法により大腸菌、イースト菌、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO細胞)、C127細胞、COS細胞、ミエローマ細胞、BHK細胞、昆虫細胞、などに産生せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したG-C S Fなどを用いることができる。本発明において用いられるG-C S Fは、遺伝子工学的的手法により製造されたG-C S Fが好ましく、哺乳動物細胞 (特にCHO細胞) を用いて製造されたG-C S Fが好ましい (例えば、特公平1-44200号公報、特公平2-5395号公報、特開昭62-129298号公報、特開昭62-132899号公報、特開昭62-236488号公報、特開昭64-85098号公報)。

#### 【0018】

本発明の線維芽細胞動員剤等には、その投与方法や剤形に応じて必要により、懸濁化剤、溶解補助剤、安定化剤、等張化剤、保存剤、吸着防止剤、海面活性化剤、希釈剤、賦形剤、pH調整剤、無痛化剤、緩衝剤、含硫還元剤、酸化防止剤等を適宜添加することができる。

#### 【0019】

懸濁剤の例としては、メチルセルロース、ポリソルベート80、ヒドロキシエチルセルロース、アラビアゴム、トラガント末、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート等を挙げることができる。

## 【0020】

溶液補助剤としては、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリソルベート80、ニコチン酸アミド、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、マグロゴール、ヒマシ油脂脂肪酸エチルエステル等を挙げることができる。

## 【0021】

安定化剤としては、デキストラン40、メチルセルロース、ゼラチン、亜硫酸ナトリウム、メタ亜硫酸ナトリウム等を挙げることができる。

等張化剤としては例えば、D-マンニトール、ソルビート等を挙げることができる。

## 【0022】

保存剤としては例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、ソルビン酸、フェノール、クレゾール、クロロクレゾール等を挙げることができる。

吸着防止剤としては例えば、ヒト血清アルブミン、レシチン、デキストラン、エチレンオキサイド・プロピレンオキサイド共重合体、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリエチレングリコール等を挙げることができる。

## 【0023】

含硫還元剤としては例えば、N-アセチルシステイン、N-アセチルホモシステイン、チオクト酸、チオジグリコール、チオエタノールアミン、チオグリセロール、チオソルビトール、チオグリコール酸及びその塩、チオ硫酸ナトリウム、グルタチオン、炭素原子数1~7のチオアルカン酸等のスルフヒドリル基を有するもの等が挙げられる。

## 【0024】

酸化防止剤としては例えば、エリソルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、 $\alpha$ -トコフェロール、酢酸トコフェロール、L-アスコルビン酸及びその塩、L-アスコルビン酸パルミテート、L-アスコルビン酸ステアレート、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、没食子酸トリアミル、没食子酸プロピルあるいはエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA)、ピロリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム等のキレート剤が挙げられる。

## 【0025】

さらには、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、炭酸水素ナトリウムなどの無機塩；クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酢酸ナトリウムなどの有機塩などの通常添加される成分を含んでもよい。

## 【0026】

本発明の線維芽細胞動員剤等は、注射剤（皮下、皮内、筋肉内、静脈内、腹腔内、など）として、または経皮、経粘膜、経鼻などの投与に適した剤形、又は経口投与に適した剤形（錠剤、カプセル剤、顆粒剤、液剤、懸濁剤など）として投与することが可能である。本発明は投与経路や剤形などによって限定されるものではない。

## 【0027】

本発明のG-CSFを有効成分とする線維芽細胞動員剤等の投与量、投与回数は対象の疾患患者の病状を配慮して当業者が適宜決定することができるが、通常、成人一人あたり0.1~500  $\mu\text{g/kg/day}$ 、好ましくは1~50  $\mu\text{g/kg/day}$ の用量でG-CSFを投与することができる。投与回数は一週間に1~7日間投与することができる。しかし、本発明はヒトG-CSFの用量によって限定されるものではない。又、本発明の線維芽細胞動員剤等は、他の薬剤と併用してもよい。

## 【実施例1】

## 【0028】

## 全骨髄移植

## (1) 骨髄移植モデルマウスの作製

8~10週齢のC57BL/6マウス(CLEA、東京、日本)に、 $4 \times 10^6$  V line ear acceleratorを用いて致死量の放射線(850 cGy)を全身に単回照射し、レシピエントマウスとして用いた。GFPトランスジェニックマウス(C57BL/6、10~



12週齢) (Okabe et al., (1997) FEBS. Lett. 407, 313-319) の大腿骨及び頸骨より骨髓粗分画を採取し、 $5 \times 10^6$  個の骨髓細胞をレシピエントマウスの尾静脈より移植した。

#### 【0029】

レシピエントの骨髓中にドナー由来の GFP 陽性骨髓細胞がどの程度生着しているか (これを「キメラ率」という) を確認するため、骨髓移植後 60 日の末梢血有核細胞について、FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) を用いて解析を行った。結果を図 1 に示す。対照マウスでは骨髓有核細胞中に GFP の発現は認められないが、骨髓移植マウスの細胞は 97.8% が GFP 陽性であった。キメラ率の多寡はドナー由来の GFP 陽性細胞を定量化する上で重要な指標となる。本実験では、骨髓移植モデルマウスとして、末梢血細胞のキメラ率が平均 95% 以上のマウスを使用した。これは、骨髓由来細胞の創傷治癒への貢献を定量評価するに足る条件を満たしているものと考えられる。

#### 【0030】

図 2 に骨髓のサイトスピン標本を示す。DAPI 染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。その結果、ほとんどの有核細胞 (青色) が緑色に発色しており、骨髓細胞が GFP 陽性であることが示された。

#### 【0031】

(2) 心筋梗塞マウスに対する G-CSF 投与の効果

骨髓移植の 60 日後、マウスに 0.5% イソフルランガスを吸入麻酔し、開胸して左心室を露出させ、左冠動脈を結紮して心筋梗塞を作製した。心筋梗塞作製後 24 時間に、生理食塩水に溶解した組換えヒト G-CSF (中外製薬 (株) 製) ( $100$  又は  $300 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) を 1 日 1 回、10 日間連続してマウスに皮下投与した (G-CSF 投与群)。対照群のマウスには生理食塩水のみを投与した。

#### 【0032】

##### 生存率

G-CSF 投与群 ( $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) 及び対照群について生存率 ( $n=68$ ) を調べた (図 3)。対照群の生存率は、心筋梗塞作製後 60 日で約 60% であったが、G-CSF 投与群の生存率は約 90% であった。

#### 【0033】

##### 形態観察

心筋梗塞作製後 60 日に、正常マウス並びに対照群及び G-CSF 投与群のマウスについて、15 MHz 整相列トランスデューサーを備えたイメージポイント 1500 超音波診断装置 (Philips Co., USA) を用いて、経胸壁心エコー (Mモード心エコー) を行い、心筋梗塞巣の形態観察を行った。マウスは、ケタミン ( $30 \text{mg}/\text{kg}$ ) 及びキシラジン ( $6 \text{mg}/\text{kg}$ ) で麻酔し、自発呼吸を維持させた。図 4 から明らかなように、対照群では、正常な左室と比較して、前壁部分の心筋が薄化し、無収縮であり、左室内径が拡大していた。これに対し、G-CSF 投与群 ( $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) では、左室拡張末期径の拡大の程度が対照群に比して抑制されていた。また、左室前壁は低収縮であるものの、対照群と比較すると有意に改善していた。

#### 【0034】

##### 心機能

心筋梗塞作製後 60 日に、対照群及び G-CSF 投与群 ( $100$  又は  $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) の Mモード画像より左室収縮末期内径 (LVESD) 及び拡張末期内径 (LVESD) を測定した ( $n=68$ )。また、拡張末期容量 (EDV) 及び収縮末期容量 (ESV) を Teichholz 法により計算した。左室駆出率 (EF) は下式により計算した。

$$EF (\%) = [(EDV - ESV) / EDV] \times 100$$

結果を、図 5 及び図 6 に示す。いずれも G-CSF 投与群で心機能の著しい改善が観察された。

#### 【0035】

## 組織学的観察

### (i) 切片の作製

マウスをケタミン ( $30\text{ mg/kg}$ ) 及びキシラジン ( $6\text{ mg/kg}$ ) で麻酔し、心臓をPBSで灌流し、PBSに溶解した4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した。心臓を取り出し、これをOCT化合物 (Miles Scientific, Naperville, IL, USA) 中に包埋し、液体窒素で急速凍結した。包埋した心臓をスライスして切片を作製した。

#### 【0036】

##### (ii) アザン染色

心筋梗塞作製後60日に、対照群及びG-CSF投与群 ( $300\text{ }\mu\text{g/kg}$ ) の心臓左心室短軸断面の凍結切片についてアザン染色を行った。結果を図7(a)に示す。対照群では左心室の径の拡大、梗塞巣の「ひ薄化」・伸展化が観察され、いわゆる心筋梗塞後のリモデリングが観察された。これに対し、G-CSF投与群では梗塞後のリモデリングは軽度であり、梗塞巣の「ひ薄化」・伸展化は軽減していた。すなわち、G-CSF投与により、心筋梗塞巣の組織が再生され、リモデリングが防止されたことが明らかとなった。また、G-CSF投与群の切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、心筋梗塞巣にGFP陽性骨髄細胞が多数浸潤していることが示された (図7(b)、右図)。

#### 【0037】

##### (iii) 免疫染色

凍結切片 ( $6\text{ }\mu\text{m}$ ) をPBSで洗浄し、抗体を用いて4℃で一晩染色した。その後、PBSで3回洗浄し、TRITC (DAKO, Japan) 結合2次抗体とともに4℃で4時間インキュベートした (赤色)。核はDAPI (Sigma Aldrich) で染色した (青色)。

#### 【0038】

共焦点レーザー顕微鏡 (LSM410; Carl Zeiss, Jena, Germany) で心筋梗塞巣の観察を行った (図8)。非梗塞巣の切片は、抗 $\alpha$ -アクチニン抗体 (clone EA-53; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) を用いて染色した。心筋細胞が赤く染色され、血管内にはGFP陽性細胞がわずかに残存していた (a)。対照群の梗塞巣では、わずかにGFP陽性細胞が観察されるのみであった (b)。これに対し、G-CSF投与群 ( $300\text{ }\mu\text{g/kg}$ ) では梗塞巣に多数のGFP陽性細胞が観察された (c)。ドナーマウスとしてLacZトランスジェニックマウス (10~12週齢; Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) を用いて (c) と同様の実験を行うことにより、(c) の梗塞巣における緑色の蛍光が非特異的な蛍光でないことを確認した (d)。また、共焦点レーザー顕微鏡で撮影した画像をコンピュータに取り込み、NIHイメージで解析した。梗塞巣に存在する単位面積あたりの細胞数に対するGFP陽性細胞数を計算した。結果を図9に示す。G-CSF投与により、骨髄由来の細胞が心筋梗塞巣に遊走したことが明らかとなった。

#### 【0039】

次に、このGFP陽性細胞が如何なる細胞であるかを確認した。

図10に抗 $\alpha$ -平滑筋アクチン抗体 (clone 1A4; Sigma Aldrich) を用いて免疫染色を行った結果を示す。骨髄由来のGFP陽性細胞が赤く染色されており、平滑筋細胞に分化していることが明らかとなった。

#### 【0040】

次に、内皮細胞マーカーであるフォンビルブランド因子 (vWF) について、抗vWF抗体 (clone F8/86; DAKO) を用いて免疫染色を行った (図11)。GFPシグナルがvWFのシグナルに囲まれている領域が認められ、GFP陽性細胞は内皮細胞にも分化していることが明らかとなった。

#### 【0041】

さらに、抗 $\alpha$ -アクチニン抗体を用いて、心筋細胞を免疫染色した (図12~図14)。図12及び図13から明らかなように、GFP陽性細胞にアクチニン陽性シグナルが認められた。また、そのうちのいくつかには横紋が見られ、心筋細胞であることが示唆された。GFP陽性細胞により、完全な横紋をもつ心筋が再生された。図14は $1\text{ }\mu\text{m}$ ごとにスライスした切片の写真である。骨髄由来のGFP陽性細胞が完全な心筋細胞を再生して

いることが示された。

#### 【0042】

心筋梗塞作製後60日に心筋梗塞巣に観察されたGFP陽性細胞中に占める、心筋細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞及び線維芽細胞の比率を図15にまとめる。細胞数は以下のようにして求めた。心臓を心尖部、中部、基部に3分割し、各々のGFP陽性細胞の面積と組織の厚みより梗塞部組織の体積を算出した。単位面積当たりのGFP陽性細胞数を計測し、GFP陽性細胞密度を求めた。GFP陽性細胞密度と梗塞部体積より、梗塞部組織中のGFP陽性細胞の細胞数を算出した。80%以上の細胞は紡錘形をしており、造血細胞とは異なる形態をしていた。また、これらの細胞はCD45陰性、Mac-1陰性であった。すなわち、心筋梗塞巣に最も多く存在するのは線維芽細胞であることが示された。

#### 【実施例2】

##### 【0043】

骨髓由来単一造血幹細胞の移植

GFPトランスジェニックマウスより骨髓を採取し、セルソーターでGFP陽性画分を分離後、c-kit陽性、Sca-1陽性、linage抗原陰性、CD34陰性の造血幹細胞を回収した。このうちの細胞1個と、別の正常ドナーマウスから採取した骨髓粗分画の $5 \times 10^6$ 個の細胞とを、致死量放射線を照射したレシピエントマウスに骨髓移植した。3ヶ月後、骨髓におけるGFP陽性細胞の生着率を確認した。麻酔開胸後、左冠動脈を結紮して心筋梗塞を作製した。その後、G-CSF ( $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) を10日間皮下投与した。G-CSF投与後10日における末梢血有核細胞数は、全骨髓移植群と単一造血幹細胞移植群で共に約30,000ぐらいであり、差は見られなかった(図16)。

##### 【0044】

単一造血幹細胞移植群(直線)と全骨髓移植群(点線)について、G-CSF投与(四角)及び非投与(丸)の場合における生存率を調べた(図17)。全骨髓移植群のみならず、単一造血幹細胞移植群においても、G-CSF投与により、有意に生存率が改善された。

##### 【0045】

次に、実施例1と同様の方法により単一造血幹細胞移植群の心筋梗塞巣の切片を作製し、抗ビメンチン抗体(PROGEN BIOTECHNIK GMBH社製、Cat. No. GP53)を用いて免疫染色を行った。図18から明らかなように、心筋梗塞巣においてGFP陽性細胞の存在が認められた。1個のGFP陽性造血幹細胞が心筋梗塞巣において生着していることが明らかとなった。また、抗ビメンチン抗体で染色されていることから、線維芽細胞への分化が認められた。

##### 【0046】

さらに、単一造血幹細胞移植群と全骨髓移植群について、G-CSF投与及び非投与の場合におけるGFP陽性細胞数を実施例1と同様にして測定した(図19)。全骨髓移植群のみならず、単一造血幹細胞移植群においても、G-CSF投与により有意にGFP陽性細胞数が増加していた。

##### 【0047】

単一造血幹細胞移植群にG-CSF投与した場合の左心室切片について抗心筋アクチン抗体を用いて免疫染色を行った(図20)。GFP陽性細胞がアクチニン陽性となっており、心筋細胞に分化していることが示された。

##### 【0048】

上記実施例1及び2において、数値は平均±SEMで示した。平均値間の有意差はANOVAにより算出した。対照群とG-CSF投与群との比較は、log-rank検定又はノンパラメトリックなFisherの多重比較検定で行った。 $p < 0.05$ を有意とした。

#### 【実施例3】

##### 【0049】

致死量の放射線照射を行った8~10週齢のC57BL/6マウスに、CAG-EGFPマウス(Okabe M. et al., FEBS Lett. 1997, 407: 313-319)の骨髓から採取した全骨

髓細胞 (w-BM)、又はc-kit陽性、Sca-1陽性、lineage抗原陰性の単一集団細胞 (KSL-SP) を尾静脈より移植した。8週間後、左冠動脈の結紮によりマウスに心筋梗塞 (MI) を作製した。MI作製後24時間に、生理食塩水 (G-CSF (-)) 又は  $300 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  の G-CSF (G-CSF (+)) を1日1回、10日間連続してマウスに皮下投与した。MI作製後8週に、マウスを解剖し、心臓を免疫組織学的に解析した。各マウス群 (n=10) あたり100サンプル標本について、梗塞巣のGFP陽性細胞、GFP陽性ビメンチン陽性細胞、及びGFP陽性アクチニン陽性細胞を計測した。GFP陽性細胞の平均値を表1に示す。

【0050】

【表1】

梗塞巣におけるGFP陽性細胞の定量解析

マウス	GFP陽性細胞		
	計*	ビメンチン陽性	アクチニン陽性
w-BM G-CSF (-)	8841	1813	65
w-BM G-CSF (+)	119802	37457	5403
KSL-SP G-CSF (-)	1224	480	0
KSL-SP G-CSF (+)	41779	9322	3

\*: 梗塞巣の全GFP陽性細胞数

【0051】

w-BM群ではビメンチン陽性細胞 (線維芽細胞) とアクチン陽性細胞 (心筋細胞) が全骨髄から再生されたが、KSL-SP群では線維芽細胞のみが再生された。この結果は、造血幹細胞からは心筋細胞が再生されないことを示唆している。心筋細胞の再生は間葉系幹細胞からの分化によると考えられる。

【0052】

次にG-CSFの効果を見ると、w-BM群では線維芽細胞及び心筋細胞を動員した。KSL-SP群では線維芽細胞を動員させたが、心筋細胞はわずか3細胞のみが観察された。この心筋細胞はおそらく再生されたものではなく、細胞融合の結果であると思われる。

【0053】

いずれの群でも、図17に示すように、G-CSF投与によって生存率が改善している。これらの効果には、w-BM群では線維芽細胞及び心筋細胞の動員が寄与しており、KSL-SP群では線維芽細胞の動員が寄与している。特に、線維芽細胞の増加は心筋梗塞部位の創傷治癒に働き、死亡率との相関が知られているリモデリングの抑制を促進するものとして重要である。

【産業上の利用可能性】

【0054】

本発明の線維芽細胞動員剤を用いることにより、わずかな骨髄由来細胞を遊走させるだけで、線維芽細胞を移植することなく心筋梗塞巣などの組織を再生し、生存率を向上させることが可能である。また、本発明の創傷治療剤を用いることにより、創傷部位の強固な治癒が可能である。

【図面の簡単な説明】

【0055】

【図 1】 骨髓移植 60 日後の末梢血有核細胞について FACS 解析を行った結果を示す図である。

【図 2】 骨髓のサイトスピン標本の共焦点レーザー顕微鏡写真である。緑色は GFP 陽性の骨髓由来細胞であることを示し、青色は DAPI 染色により有核細胞であることを示す。

【図 3】 心筋梗塞作製後、G-CSF を 10 日間皮下投与したマウス（G-CSF 投与群）、及び生理食塩水を投与したマウス（対照群）についての生存率を示した図である。

【図 4】 心筋梗塞作製後 60 日での経胸壁心エコー M モード画像である。上から、正常マウス、対照マウス及び G-CSF 投与（ $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ）マウスの左室を示す。

【図 5】 心筋梗塞作製後 60 日における、左室駆出率に対する G-CSF 投与の効果を示すグラフである。左から、正常群、G-CSF 投与群（ $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ）及び G-CSF 投与群（ $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ ）の結果を示す。

【図 6】 心筋梗塞作製後 60 日における、左室拡張末期径に対する G-CSF 投与の効果を示すグラフである。左から、正常群、G-CSF 投与群（ $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ）及び G-CSF 投与群（ $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ ）の結果を示す。

【図 7 (a)】 心筋梗塞作製後 60 日における対照群（左図）及び G-CSF 投与群（右図）の心臓左心室短軸断面についてのアザン染色図である。赤色部分が筋線維、青色部分が膠原線維を示す。

【図 7 (b)】 心筋梗塞作製後 60 日における G-CSF 投与群の心臓左心室短軸断面についてのアザン染色図（左図）及び共焦点レーザー顕微鏡写真（右図）である。

【図 8】 心筋梗塞巣の共焦点レーザー顕微鏡写真である。（a）は非梗塞巣、（b）は対照群における心筋梗塞巣、（c）は G-CSF 投与群（ $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ）の心筋梗塞巣を示す。（d）は Lac-Z トランスジェニックマウスに G-CSF を投与（ $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ）した場合の心筋梗塞巣を示す。

【図 9】 心筋梗塞巣に存在する GFP 陽性細胞数を示すグラフである。

【図 10】 心筋梗塞巣を、抗  $\alpha$ -平滑筋アクチン抗体を用いて免疫染色したときの共焦点レーザー顕微鏡写真である。緑色は GFP 陽性細胞、青色は DAPI により染色された核、赤色は  $\alpha$ -平滑筋アクチンを示す。

【図 11】 心筋梗塞巣を、抗フォンビルブランド因子（vWF）抗体を用いて免疫染色したときの共焦点レーザー顕微鏡写真である。緑色は GFP 陽性細胞、青色は DAPI により染色された核、赤色は vWF を示す。

【図 12】 心筋梗塞巣を、抗アクチニン抗体を用いて免疫染色したときの顕微鏡写真である。緑色は GFP 陽性細胞、青色は DAPI により染色された核、赤色はアクチニンを示す。

【図 13】 心筋梗塞巣を、抗アクチニン抗体を用いて免疫染色したときの顕微鏡写真である。緑色は GFP 陽性細胞、青色は DAPI により染色された核、赤色はアクチニンを示す。

【図 14】 心筋梗塞巣を  $1 \mu\text{m}$  ごとにスライスした切片について、抗アクチニン抗体を用いて免疫染色したときの顕微鏡写真である。緑色は GFP 陽性細胞、青色は DAPI により染色された核、赤色はアクチニンを示す。

【図 15】 G-CSF 投与後の心筋梗塞巣における GFP 陽性細胞の種類別の割合を示すグラフである。

【図 16】 全骨髓移植群及び単一造血幹細胞移植群における末梢血有核細胞数に対する G-CSF 投与の効果を示すグラフである。

【図 17】 心筋梗塞作製後の生存率に対する G-CSF 投与の効果を示す図である。図中、点線は全骨髓移植群、直線は単一造血幹細胞移植群を示し、四角は G-CSF 投与群（+）、丸は G-CSF 非投与群（-）を示す。

【図 18】 単一造血幹細胞移植群における心筋梗塞巣を抗ビメンチン抗体で免疫染色

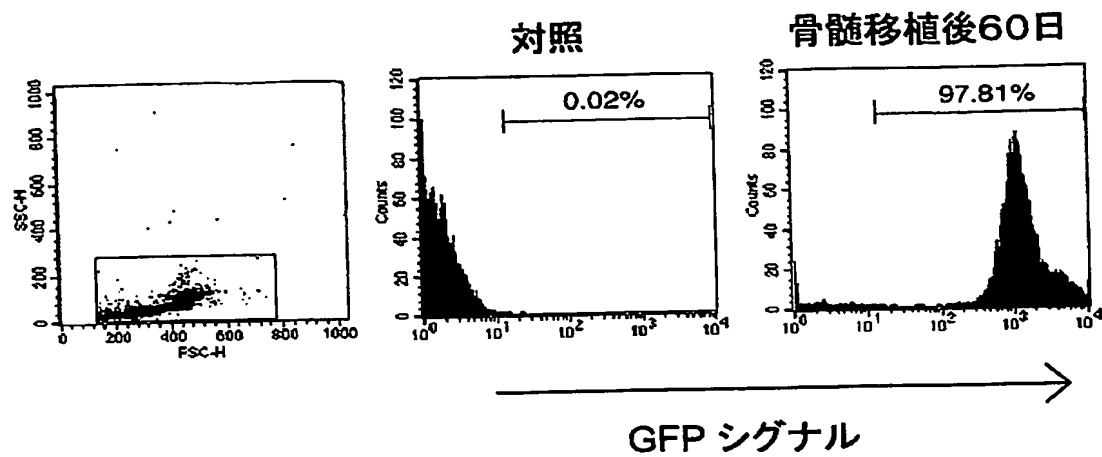
したときの共焦点レーザー顕微鏡写真である。緑色はGFP陽性細胞、青色はDAPIにより染色された核、赤色はビメンチンを示す。

【図19】全骨髄移植群及び単一造血幹細胞移植群におけるGFP陽性細胞数に対するG-CSF投与の効果を示すグラフである。

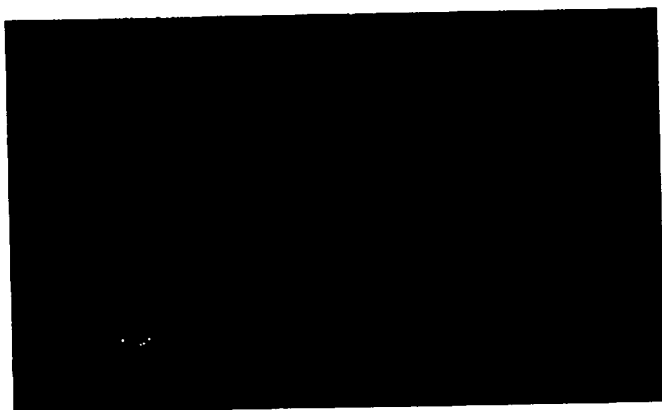
【図20】単一造血幹細胞移植群にG-CSF投与した場合の心筋梗塞境界領域について抗アクチニン抗体を用いて免疫染色したときの共焦点レーザー顕微鏡写真である。緑色はGFP陽性細胞、青色はDAPIにより染色された核、赤色はアクチニンを示す。

【書類名】図面

【図1】

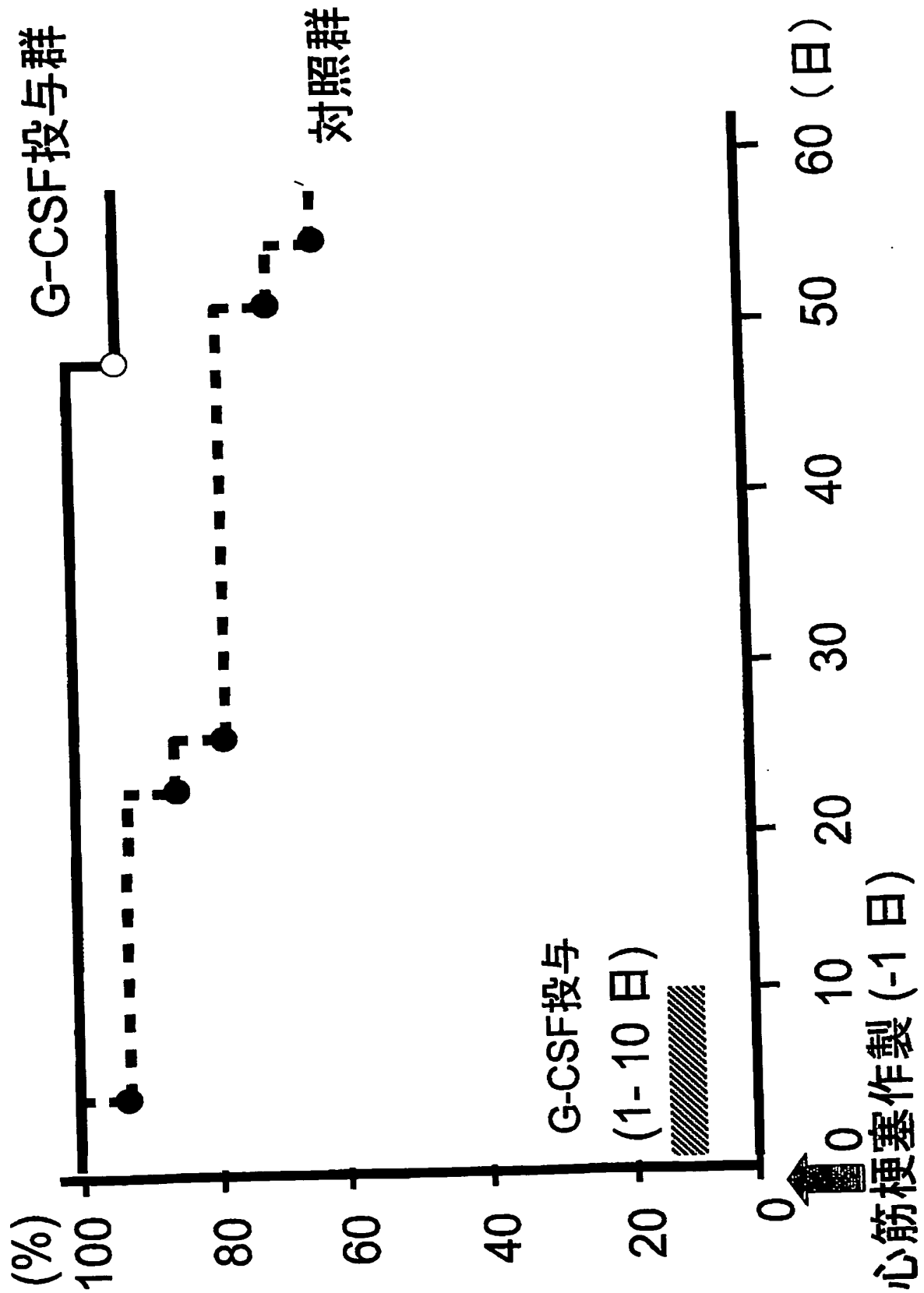


【図2】



緑: GFP  
青: DAPI

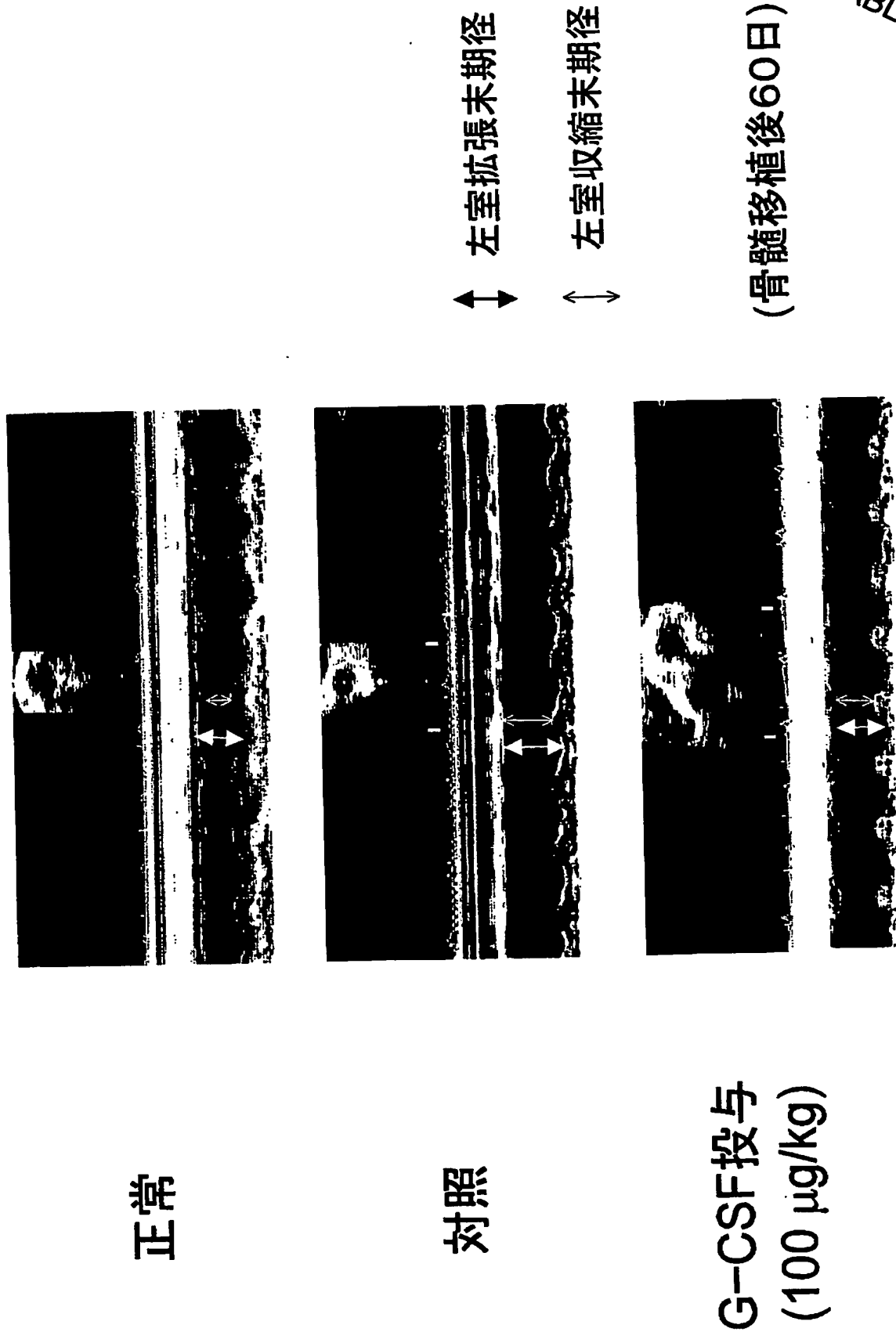
【図3】



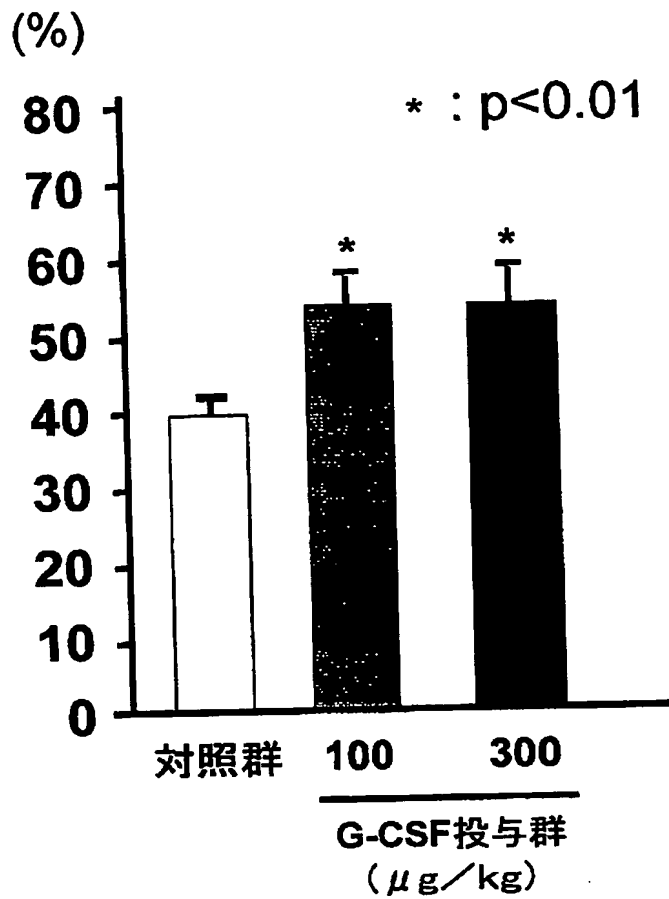


BEST AVAILABLE COPY

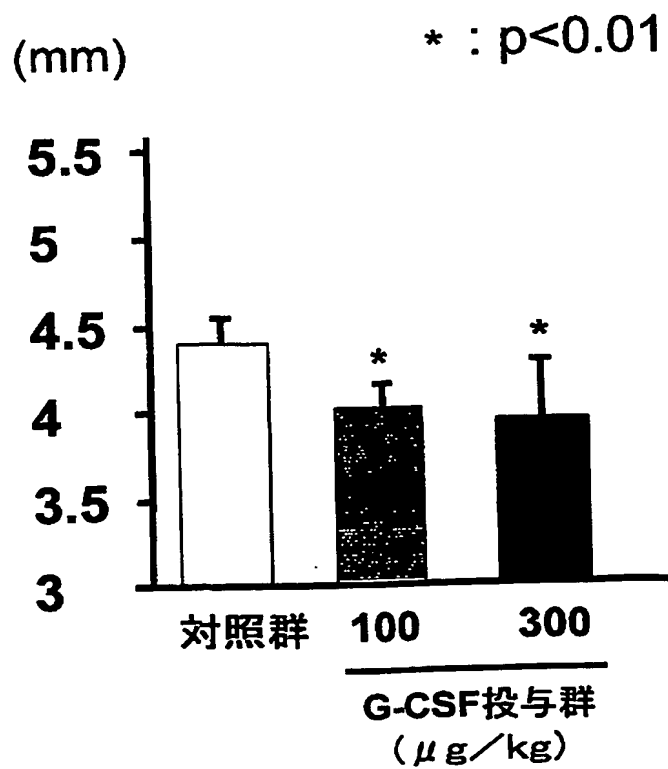
【図4】



【図5】



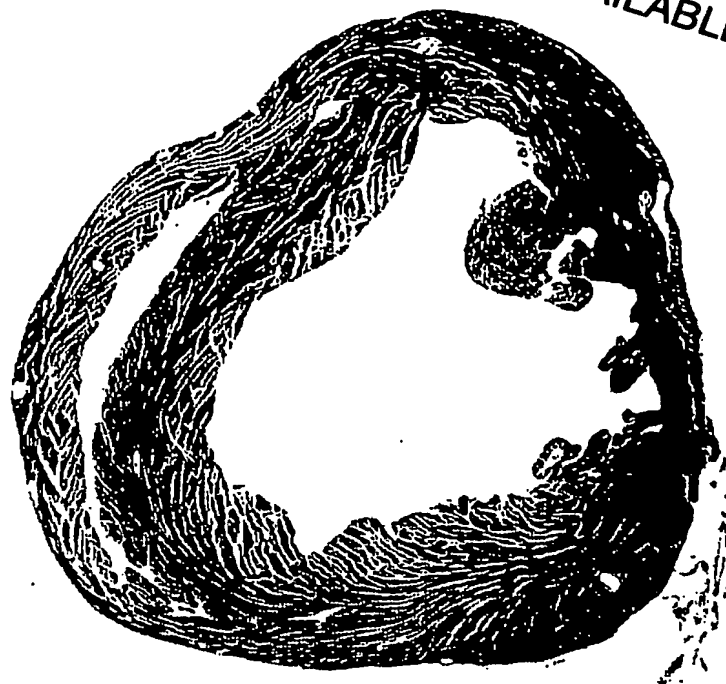
【図6】



【図7(a)】

G-CSF投与群

対照群



BEST AVAILABLE COPY

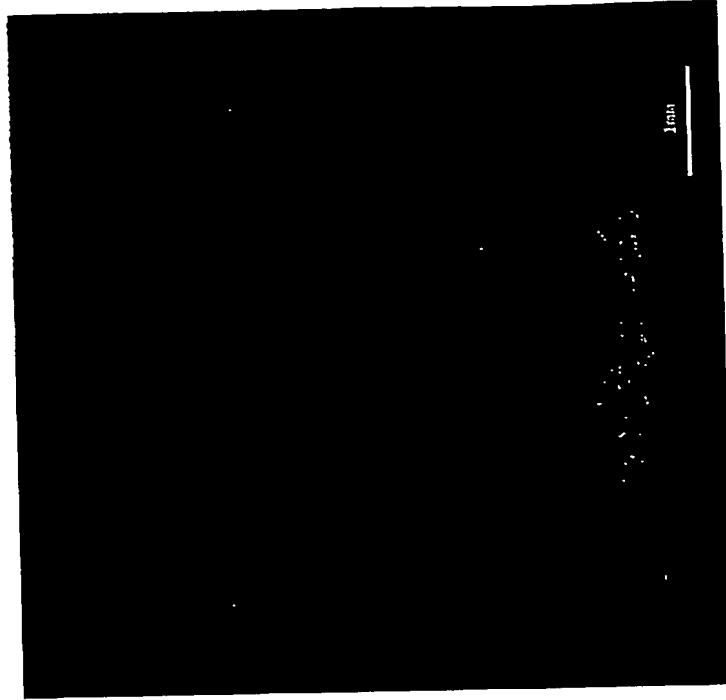
アザン染色

Fig. 7 (a)

BEST AVAILABLE COPY

【図7(b)】

共焦点レーザー顕微鏡



心筋梗塞後60日

アザン染色

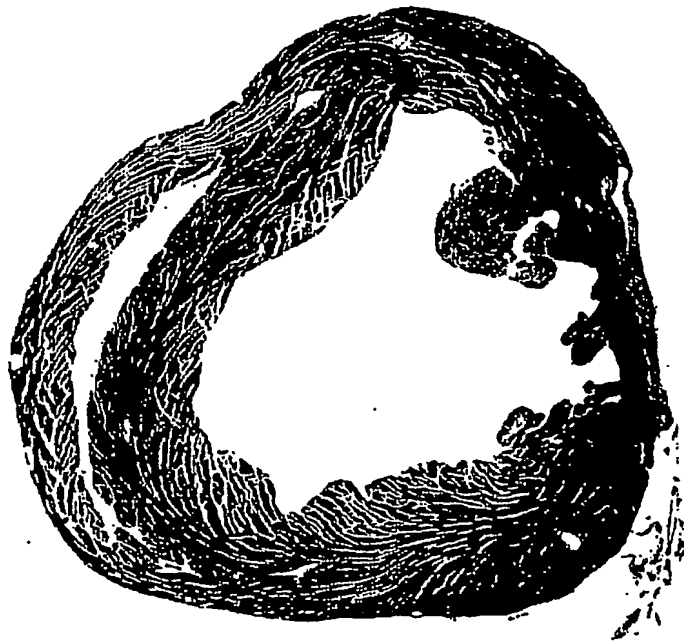
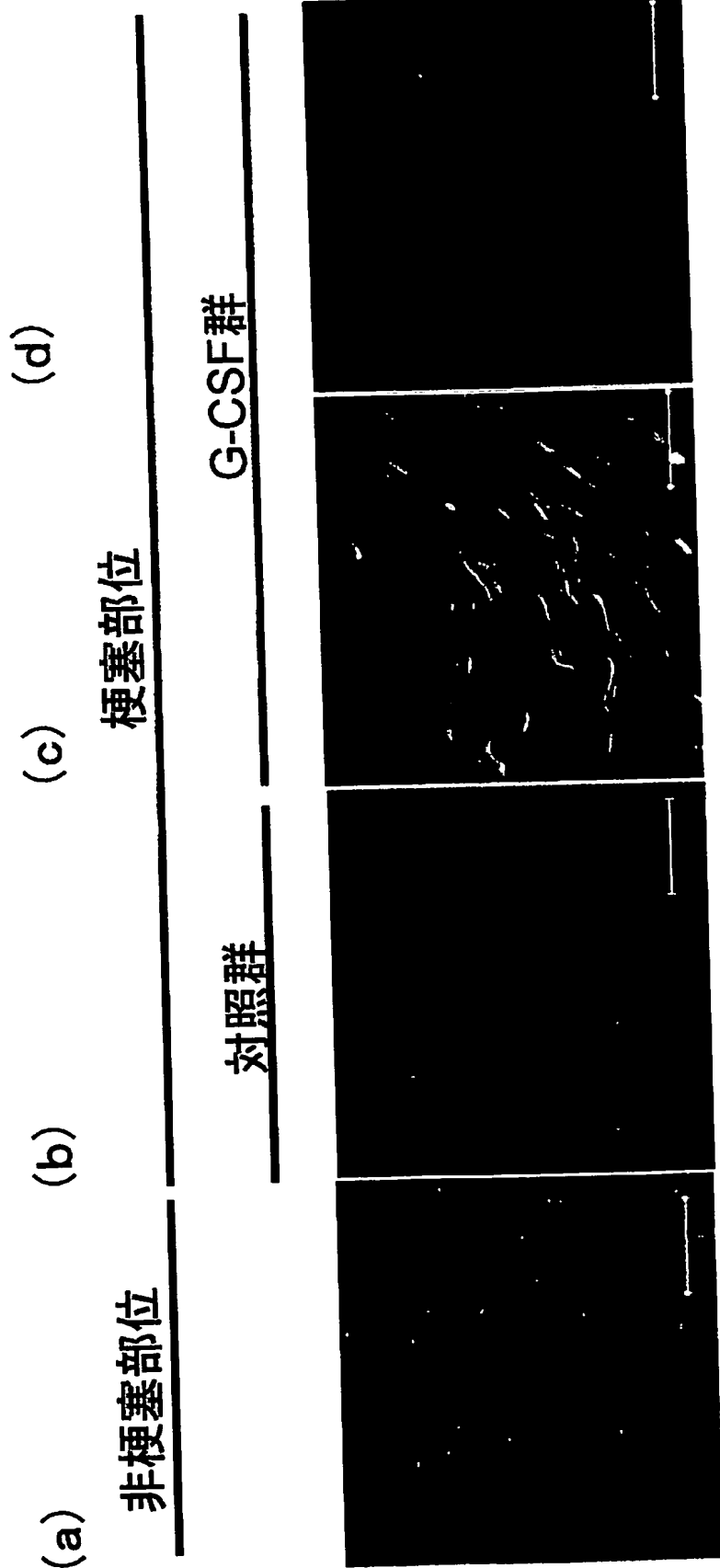


Fig. 7 (b)

【図8】



BEST AVAILABLE COPY

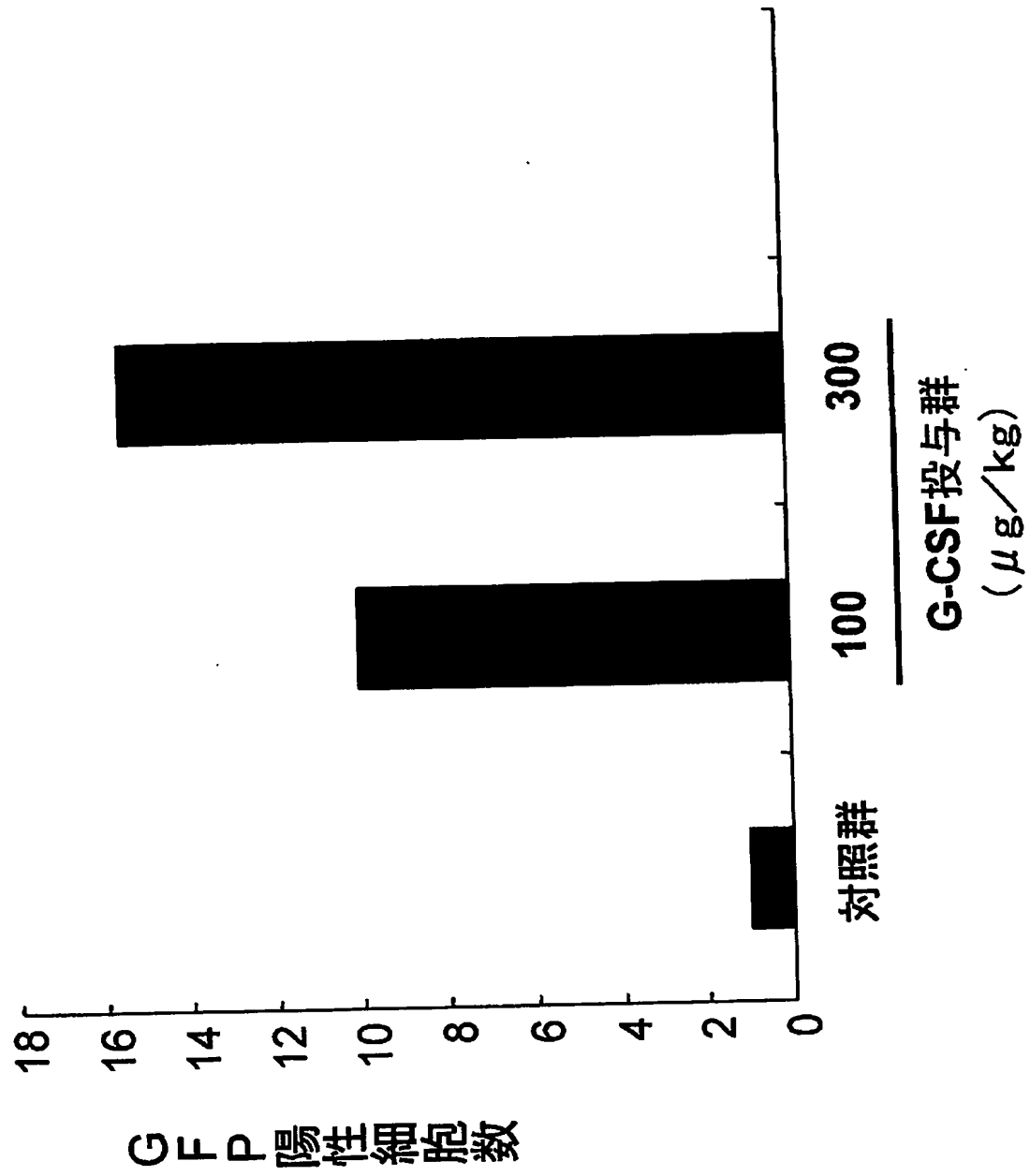
LacZ-Tg マウス  
骨髄移植群

心筋梗塞後60日目

GFP-Tgマウス骨髄移植群

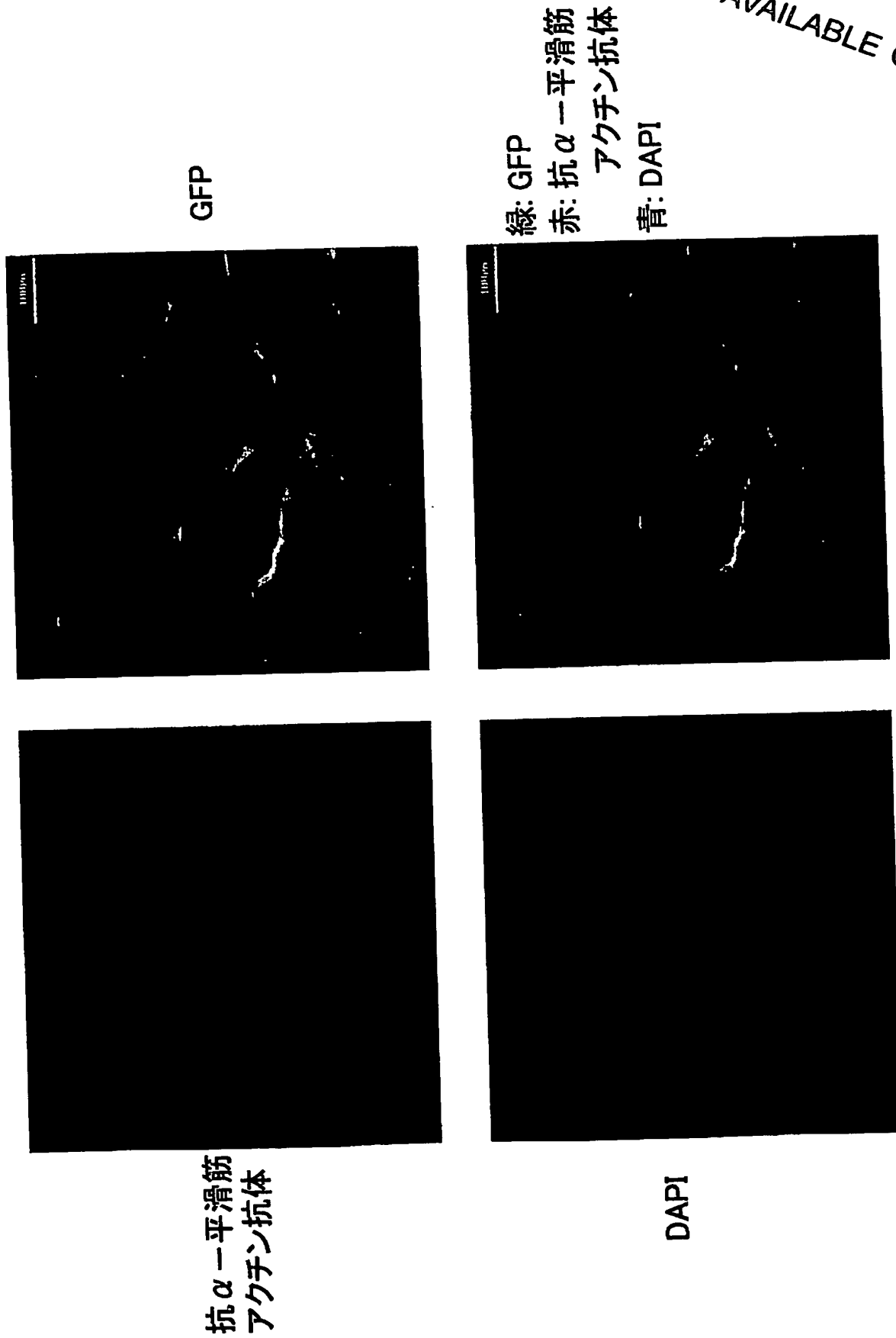
緑: GFP  
赤: 抗 $\alpha$ -アクトニン抗体  
青: DAPI

【図 9】

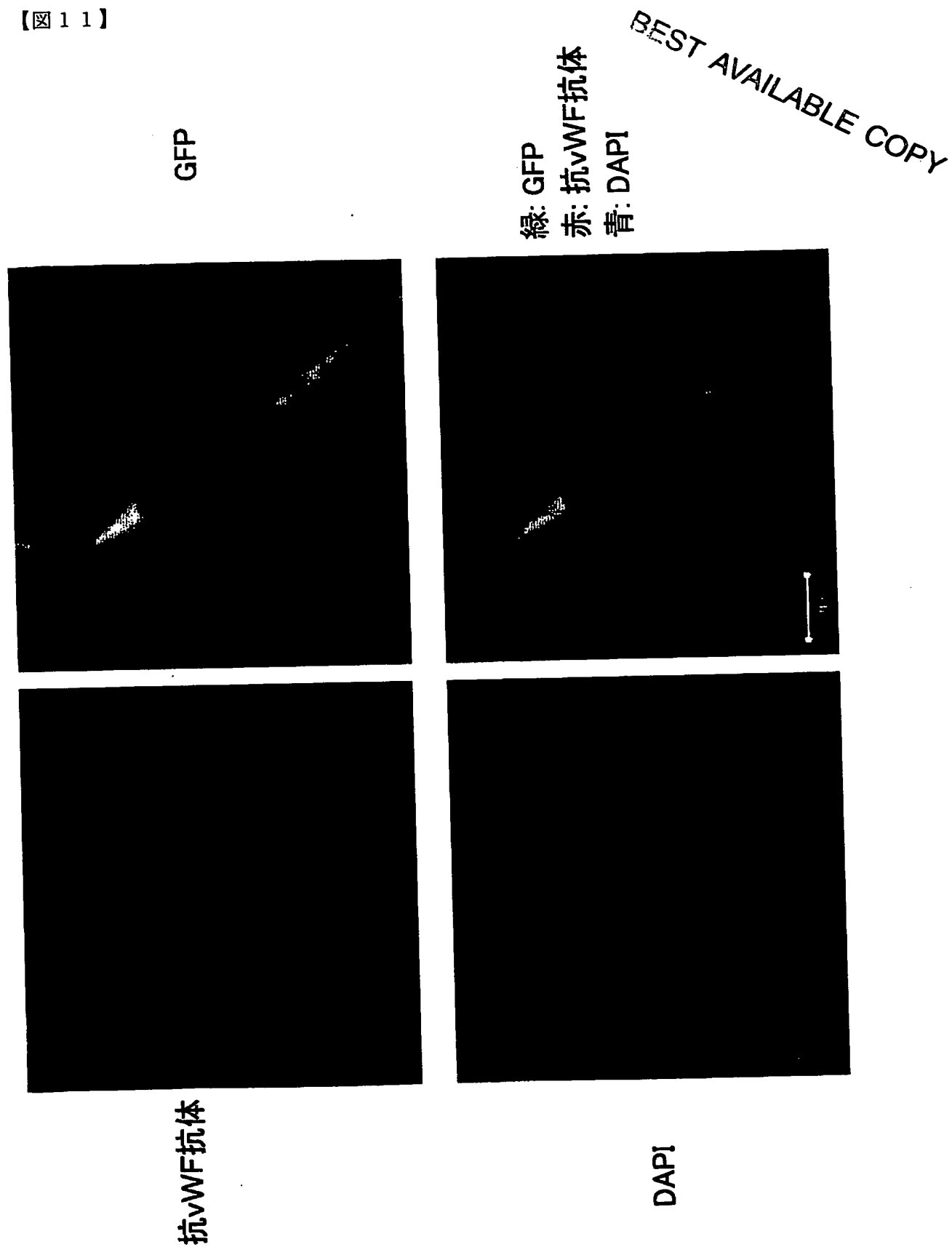


【図10】

BEST AVAILABLE COPY



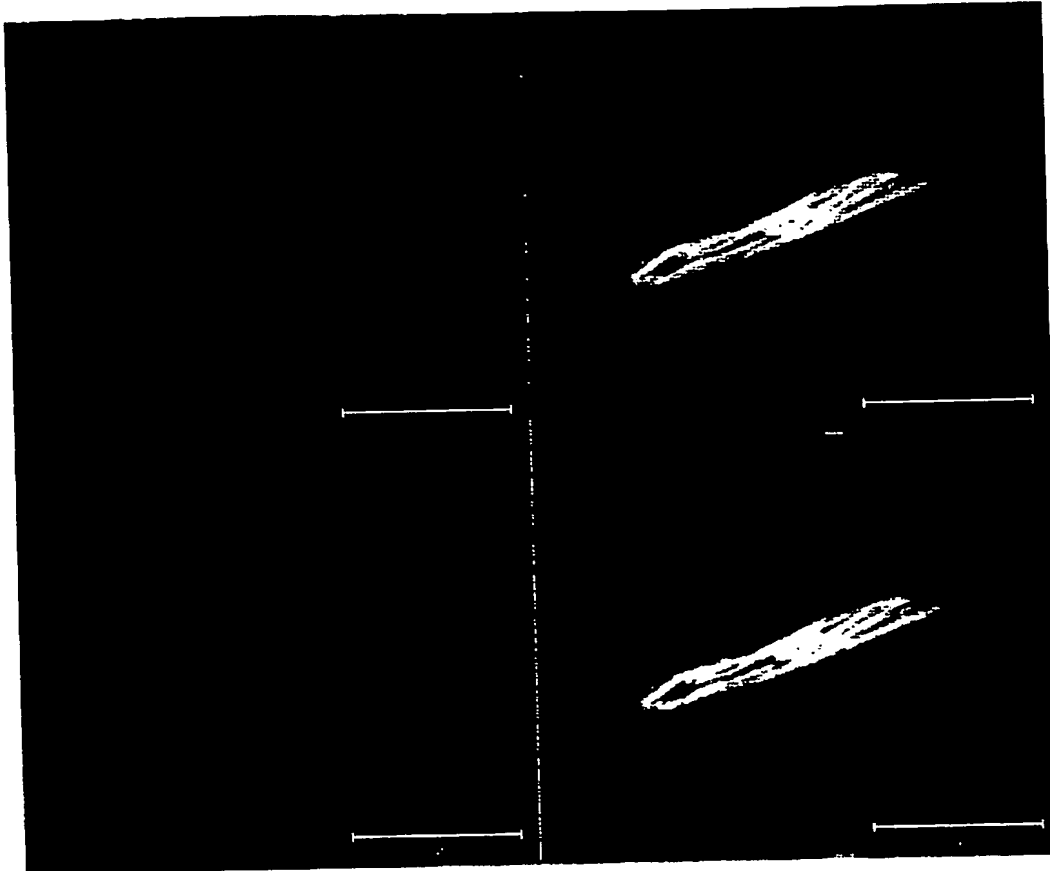
【図 11】





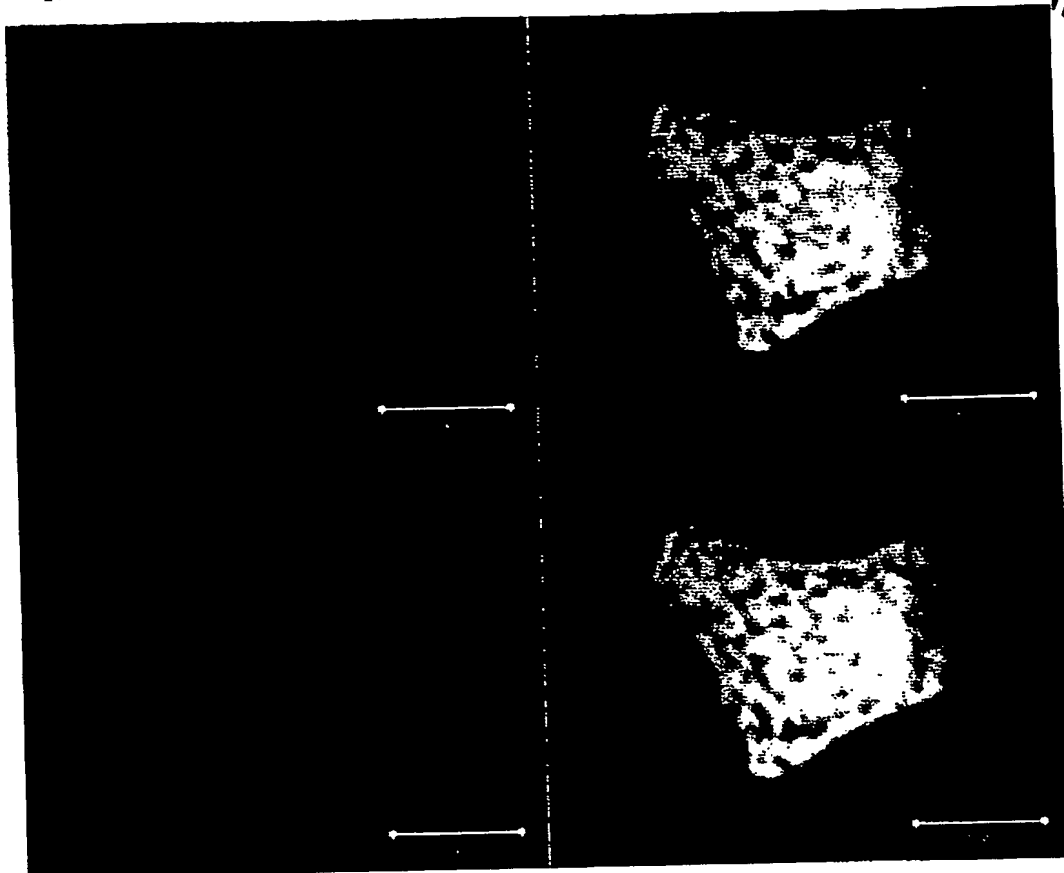
BEST AVAILABLE COPY

【図 12】



緑: GFP  
赤: 抗心筋アクチニン抗体  
青: DAPI

【図 13】



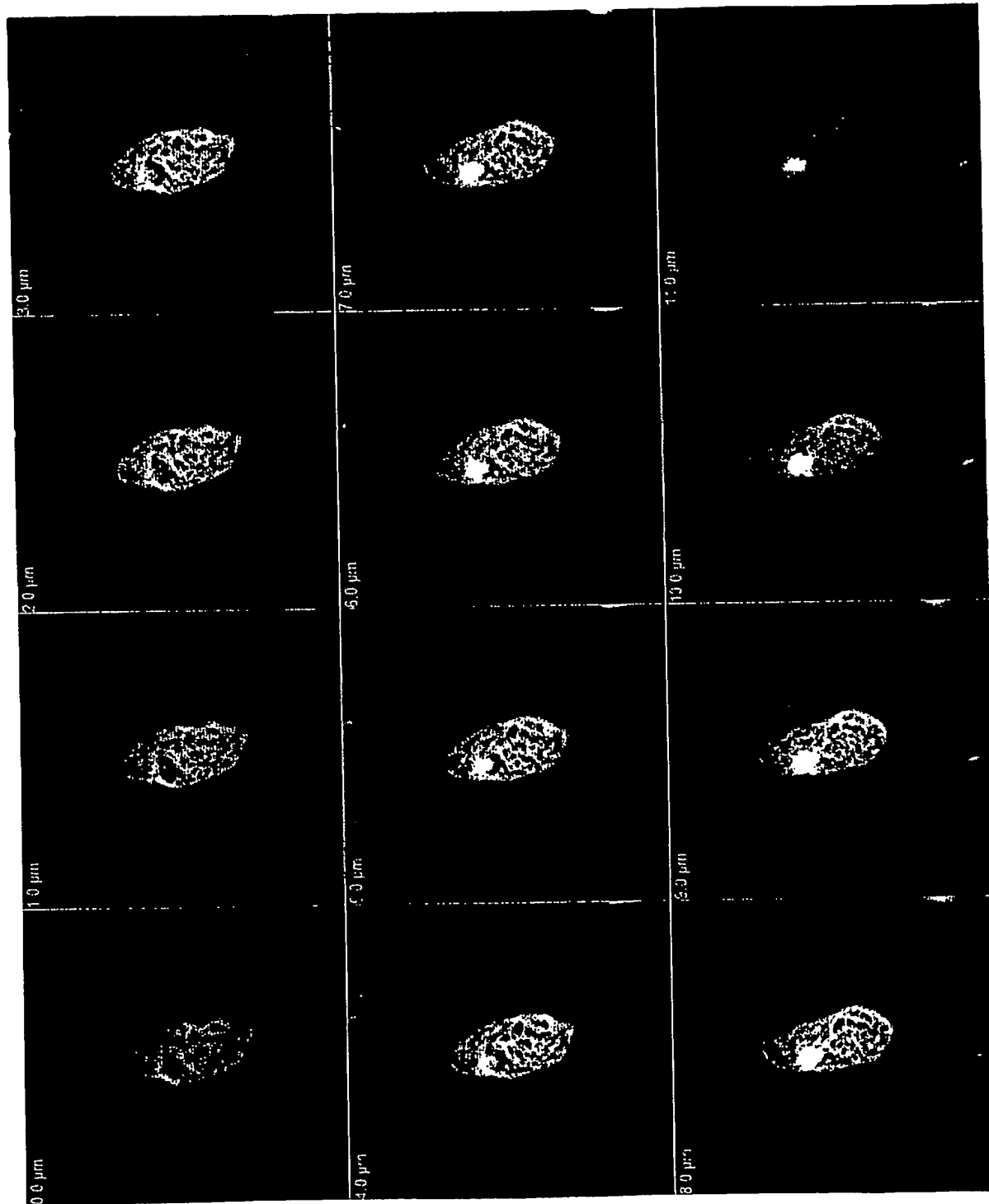
緑: GFP

赤: 抗心筋アクチニン抗体

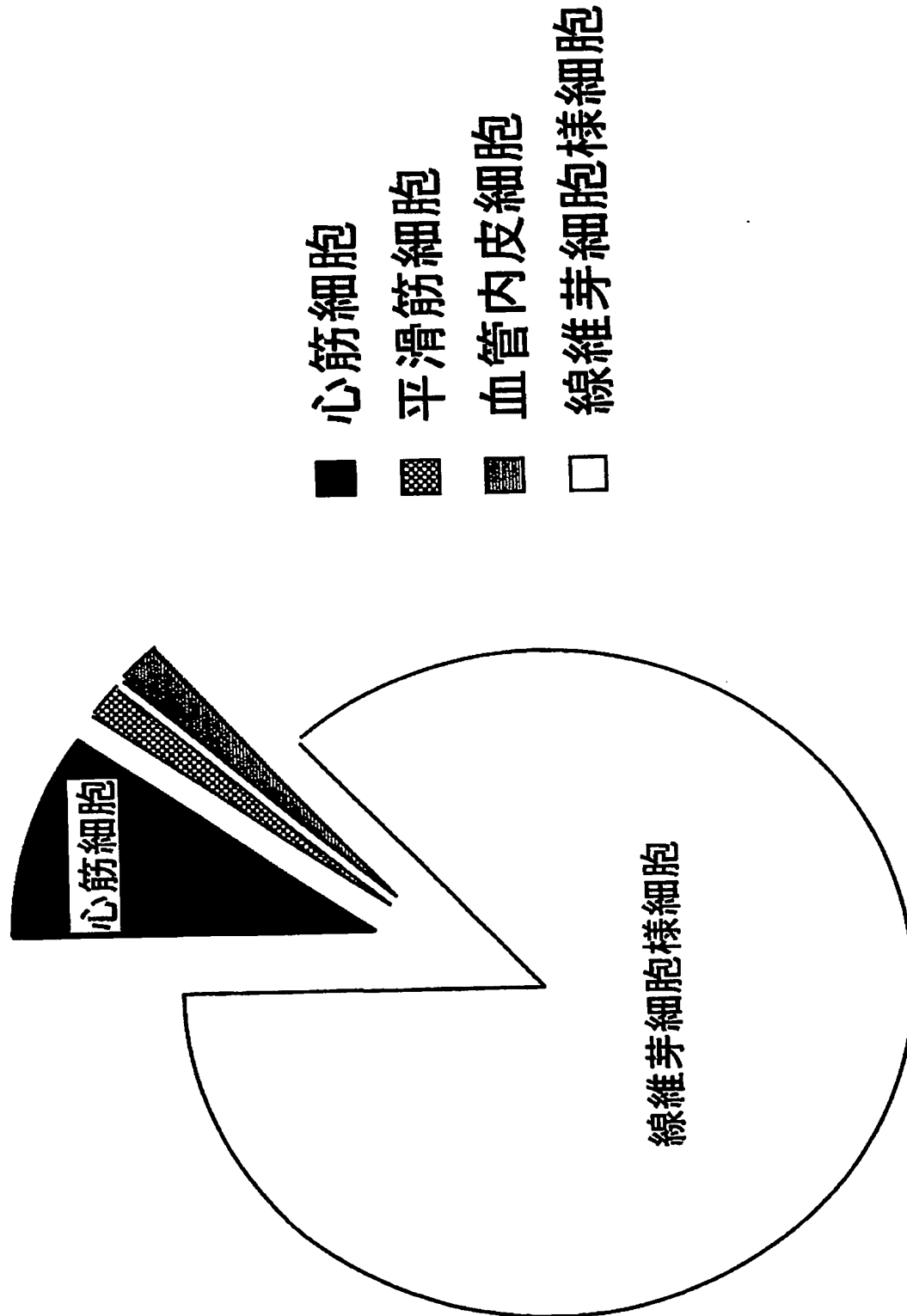
青: DAPI

【図 14】

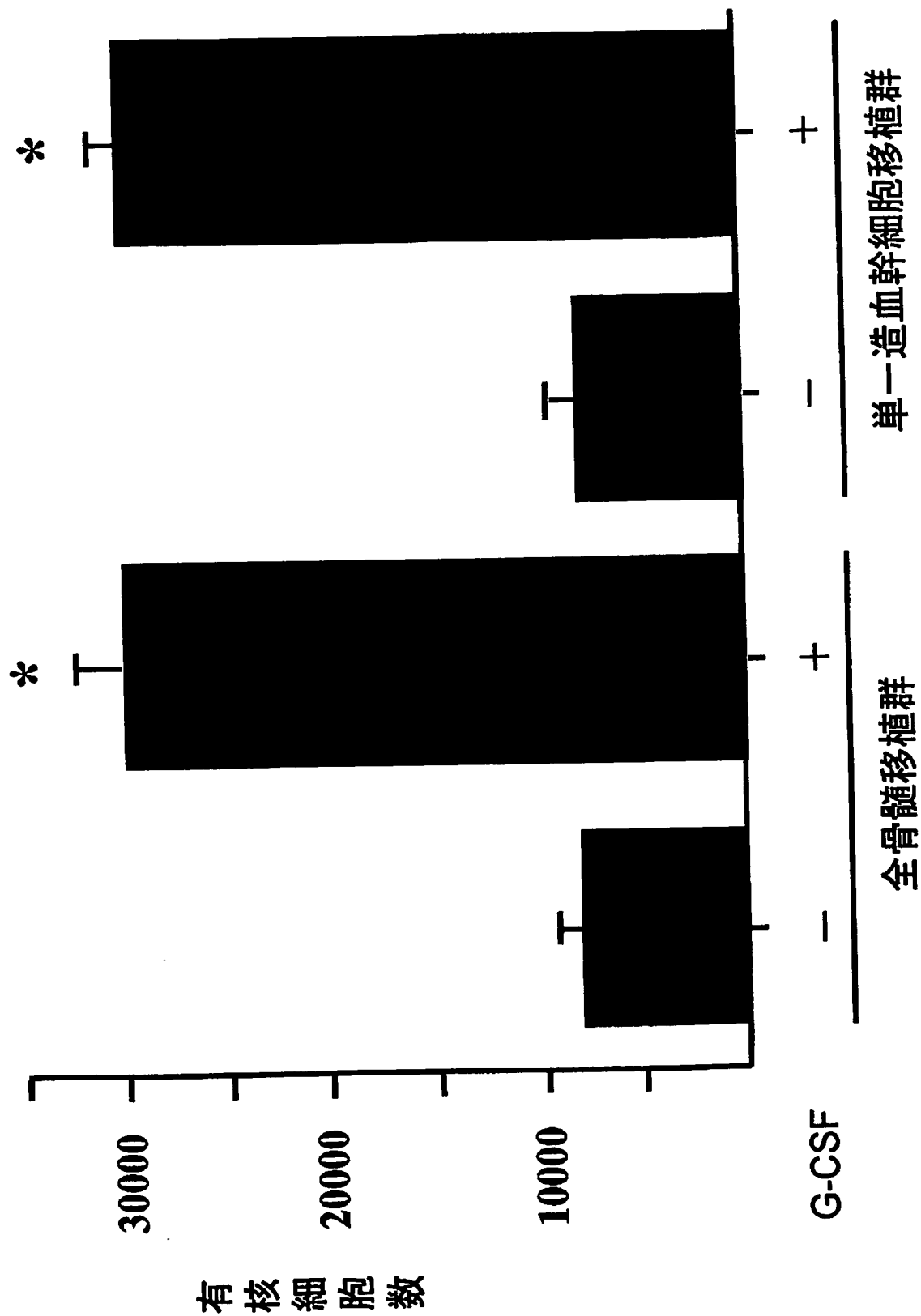
BEST AVAILABLE COPY



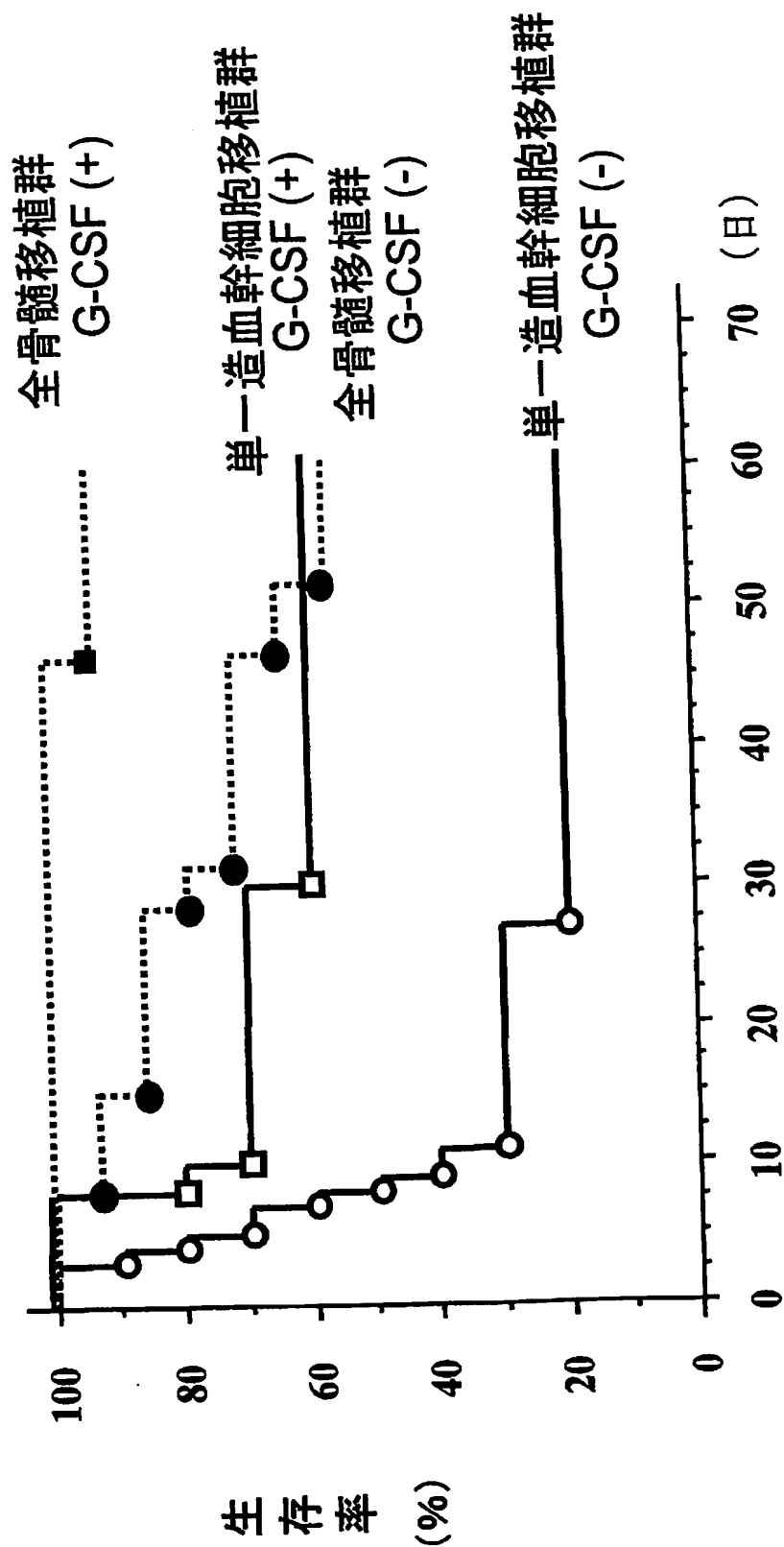
【図 15】



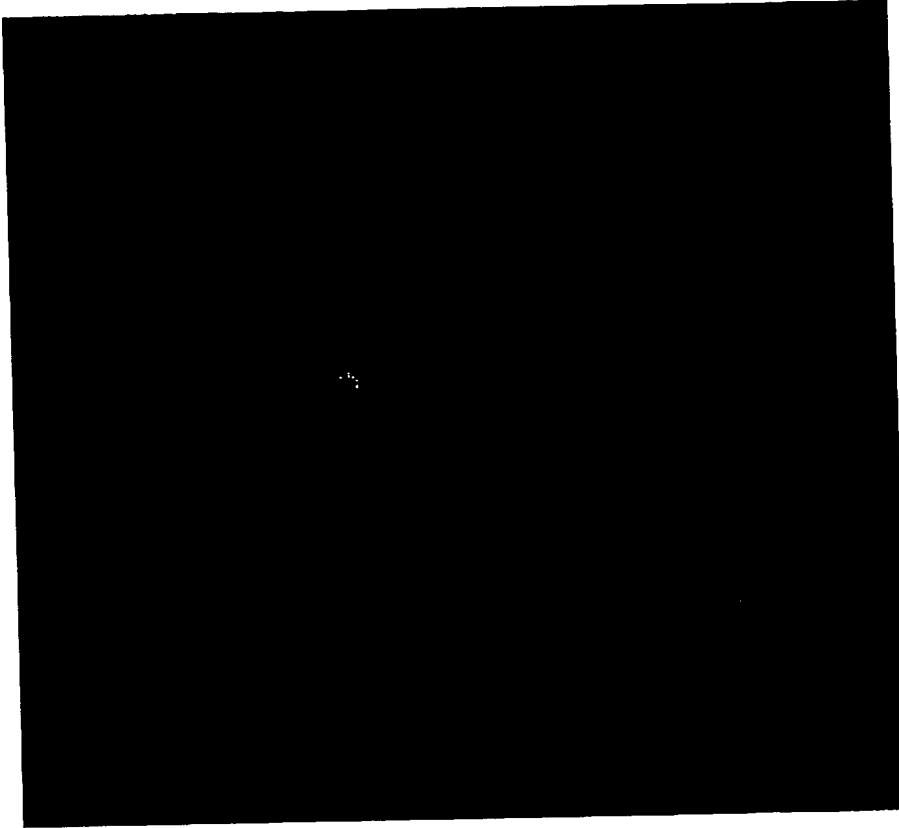
【図 16】



【図 17】



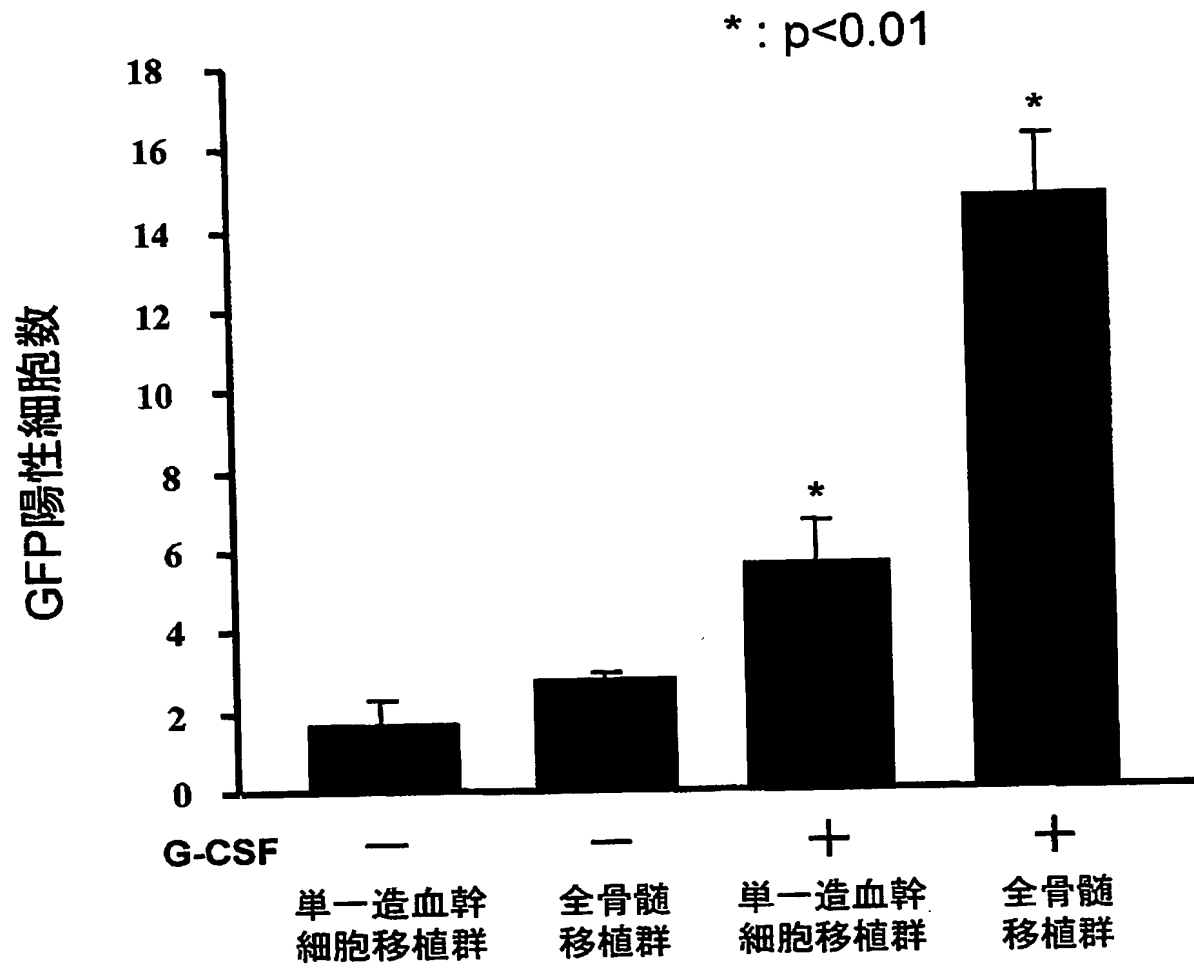
【図18】



緑: GFP  
赤: 抗ビメンチン抗体  
青: DAPI



【図 19】





【図20】

緑: GFP  
赤: 抗心筋アクトニン抗体  
青: DAPI

BEST AVAILABLE COPY



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 線維芽細胞を移植することなく、簡便に線維芽細胞を創傷組織に動員し、線維芽細胞を創傷組織に生着させ、そして創傷を治療すること。

【解決手段】 G-CSFを投与することにより、心筋梗塞巣に線維芽細胞が移動し、心機能の低下が防止され、心臓のリモデリングを改善する。

【選択図】 なし

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-036613
受付番号	50400235757
書類名	特許願
担当官	神田 美恵 7397
作成日	平成 16 年 2 月 19 日

## &lt; 認定情報・付加情報 &gt;

## 【特許出願人】

【識別番号】	598121341
【住所又は居所】	東京都港区三田二丁目 15 番 45 号
【氏名又は名称】	学校法人慶應義塾

## 【特許出願人】

【識別番号】	000003311
【住所又は居所】	東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号
【氏名又は名称】	中外製薬株式会社

## 【代理人】

【識別番号】	申請人
【住所又は居所】	100089705
【氏名又は名称】	東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 206 区 ユアサハラ法律特許事務所
【氏名又は名称】	社本 一夫

## 【選任した代理人】

【識別番号】	100076691
【住所又は居所】	東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 206 区 ユアサハラ法律特許事務所
【氏名又は名称】	増井 忠次

## 【選任した代理人】

【識別番号】	100075270
【住所又は居所】	東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 206 区 ユアサハラ法律特許事務所
【氏名又は名称】	小林 泰

## 【選任した代理人】

【識別番号】	100080137
【住所又は居所】	東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 206 区 ユアサハラ法律特許事務所
【氏名又は名称】	千葉 昭男

## 【選任した代理人】

【識別番号】 100096013  
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町  
ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所  
【氏名又は名称】 富田 博行

特願 2004-036613

出願人履歴情報

識別番号

[598121341]

1. 変更年月日

1998年 9月 4日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都港区三田二丁目15番45号

氏 名

学校法人慶應義塾

特願 2 0 0 4 - 0 3 6 6 1 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 3 3 1 1 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 9 月 5 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号

氏 名

中外製薬株式会社